

Título: NUEVAS ESTRATEGIAS METABOLÓMICAS Y QUIRALES POR TÉCNICAS (MICRO)SEPARATIVAS PARA LA BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES Y LA DETERMINACIÓN ENANTIOMÉRICA DE COMPUESTOS DE INTERÉS BIOLÓGICO

Nombre: BERNARDO BERMEJO, SAMUEL

Universidad: Universidad de Alcalá

Departamento: Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química

Fecha de lectura: 21/11/2022

Mención a doctor europeo: concedido

Programa de doctorado: Programa de Doctorado en Química por la Universidad de Alcalá

Dirección:

> **Director:** MARÍA LUISA MARINA ALEGRE

> **Codirector:** MARÍA CASTRO PUYANA

> **Codirector:** ELENA SÁNCHEZ LÓPEZ

Tribunal:

> **presidente:** ANA MARÍA GARCÍA CAMPAÑA

> **secretario:** Marichel Plaza del Moral

> **vocal:** JORGE AUGUSTO MACHADO PEREIRA

Descriptores:

> QUIMICA ANALITICA

> ANALISIS CROMATOGRAFICO

> ESPECTROSCOPIA DE MASAS

> AMINOACIDOS

El fichero de tesis ya ha sido incorporado al sistema

Localización: BIBLIOTECA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD. CAMPUS UNIVERSITARIO. 28805-ALCALA DE HENARES.

Resumen: El desarrollo de estrategias metabólicas y quirales es uno de los principales retos de la Química Analítica en la actualidad. La metabólica es una tecnología ómica que constituye una herramienta muy potente para caracterizar sistemas biológicos. El potencial de la metabólica no dirigida para la búsqueda de biomarcadores de patologías es indudable. Ello la convierte en un medio muy relevante para proporcionar nuevo conocimiento en el estudio de diferentes alteraciones que tienen lugar en el cuerpo humano. Además, el hecho de que no solo muchos biomarcadores sino también otros compuestos tales como ingredientes alimentarios, fármacos, agroquímicos o contaminantes, entre otros, sean quirales, destaca el impacto de la quiralidad en numerosos campos científicos. Dadas las diferentes propiedades que pueden tener los

enantiómeros de un compuesto quiral, se hace necesario distinguir estos enantiómeros para estudiar su papel en procesos patológicos, controlar la calidad de formulaciones farmacéuticas/agroquímicas o suplementos alimenticios, detectar adulteraciones alimentarias o estudiar la toxicidad real de muestras ambientales, entre otros.

Esta Tesis Doctoral se centra en el desarrollo, por una parte, de estrategias metabolómicas no dirigidas con aplicación a estudiar diferentes sistemas biológicos, y, por otra parte, de metodologías quirales que permitan la separación y la determinación enantiomérica de compuestos de interés biológico como biomarcadores de patologías o ingredientes alimentarios. Las técnicas de micro-separación tales como la micro-Cromatografía de líquidos de alta eficacia (micro-HPLC, micro-High Performance Liquid Chromatography) y la Electroforesis Capilar (CE) acopladas a detección óptica o de Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS) han sido las empleadas para alcanzar este objetivo.

La nefropatía diabética es una de las complicaciones originadas por altos niveles de glucosa en sangre y puede derivar en la pérdida crónica de la función renal. Aunque es conocido que el túbulo proximal renal juega un papel crítico en la progresión de esta patología, es necesario investigar los mecanismos moleculares involucrados. En este contexto, el Capítulo III describe el desarrollo de dos estrategias metabolómicas no dirigidas basadas en HPLC-HRMS y CE-HRMS para la búsqueda de biomarcadores de la nefropatía diabética a través del estudio, por primera vez, de los cambios metabólicos inducidos por altos niveles de glucosa en células de túbulo proximal renal humano HK-2. Con este fin, se optimizó un tratamiento de muestra para maximizar el número de metabolitos extraídos de las células HK-2 estudiadas, se analizaron los fluidos intra- y extracelular de las células expuestas a alta glucosa (25 mM), glucosa normal (5.5 mM) o control osmótico (5.5 mM glucosa + 19.5 mM manitol), y se optimizaron las condiciones de separación cromatográficas (RPLC e HILIC) y electroforéticas junto con los parámetros instrumentales de la detección por QTOF-MS empleada. Se investigó la influencia del tamaño de las placas Petri, de la naturaleza (acetronitrilo o metanol) y el porcentaje de disolvente orgánico en el medio de extracción y el efecto de la ultrasonificación, en el número de metabolitos extraídos. Se optimizó la composición de las fases móviles utilizadas en RPLC e HILIC y del medio de separación usado en CE así como las variables instrumentales que afectan a la detección por HRMS. El adecuado tratamiento estadístico de los resultados obtenidos mediante las técnicas ortogonales y complementarias empleadas en este trabajo, permitió proponer una serie de metabolitos que denotaban diferencias entre los grupos experimentales de las muestras en estudio. Algunos de estos metabolitos se identificaron inequívocamente (nivel 1 de acuerdo con las pautas MSI) mientras que otros se identificaron tentativamente (nivel 2 de acuerdo con las pautas MSI). También se describieron las rutas metabólicas afectadas.

La deficiencia de oxígeno en células, tejidos y órganos puede originar diferentes enfermedades y trastornos. De hecho, la hipoxia se considera un factor relevante en la patofisiología del daño renal agudo y de la enfermedad crónica de riñón. Con el fin de avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en los efectos de la hipoxia, en el Capítulo IV se llevó a cabo, por primera vez, un estudio de un modelo in vitro de alteraciones metabólicas inducidas por hipoxia en células de túbulo proximal renal humano HK-2. Para ello, se aplicó una estrategia metabolómica no dirigida basada en RPLC-HRMS. Se analizaron diferentes grupos de células, cultivadas en condiciones de normoxia e hipoxia a 0.5, 5, 24 y 48 h, y se consideraron los fluidos intra- y extracelular. Los metabolitos afectados se identificaron y se estableció su relevancia biológica.

Los cuerpos apoptóticos (ABs, Apoptotic Bodies) son vesículas extracelulares formadas durante la apoptosis, una forma de muerte celular programada. Investigaciones recientes habían mostrado que los ABs son capaces de inducir apoptosis en células HK-2 sanas. Con el objeto de elucidar los cambios metabólicos asociados a la

inducción de apoptosis en estas células, el Capítulo V describe, por primera vez, el análisis metabolómico no dirigido por RPLC-QTOF-MS para estudiar las alteraciones que tienen lugar en ABs generados en células HK-2 inducidas por dos tratamientos: cisplatino y luz UV.

En el contexto de las separaciones quirales, en esta Tesis Doctoral se han desarrollado diferentes metodologías analíticas que permiten la determinación enantiomérica de compuestos de interés biológico, tales como el metabolito de gran relevancia clínica 2-hidroxi-glutarato (2-HG) y dos aminoácidos empleados para elaborar suplementos dietéticos o nutricosméticos, triptófano y 4-hidroxi-prolina.

Dado que únicamente el D-enantiómero del 2-HG es el que se considera oncometabolito, característico de cánceres asociados con isocitrato dehidrogenasas 1 o 2 (IDH1/2), la determinación enantiomérica de 2-HG es muy relevante a nivel clínico. Las estrategias actuales para la cuantificación de 2-HG están centradas en el empleo de instrumentos MS tales como QqQ que tienen elevado coste. El uso de fragmentación/anotación en la fuente mejorada (EISA) en un analizador de masas sencillo surge como una forma importante para obtener resultados cuantitativos selectivos y sensibles. El Capítulo VI presenta el desarrollo de una metodología RPLC-EISA-TOF para la separación de los correspondientes diastereómeros obtenidos en la derivatización de los enantiómeros de 2-HG con el agente ópticamente puro L-DATAN. El protocolo detallado que se describe en este capítulo muestra que EISA utilizando un detector MS sencillo (TOF o Q) proporcionó características analíticas similares al empleo de MS/MS pero a menor coste. La metodología desarrollada se aplicó al análisis de líneas celulares de condrosarcoma mutante IDH1 y muestras de suero de pacientes con leucemia mieloide aguda. Los altos niveles encontrados de D-2-HG en estas muestras demostraron la idoneidad de esta aproximación en el entorno clínico.

Los aminoácidos se emplean frecuentemente como ingredientes alimentarios en la elaboración de suplementos dietéticos o nutricosméticos. Teniendo en cuenta que muchos de estos compuestos son quirales y que la adición de los D-enantiómeros está prohibida, son necesarias metodologías analíticas quirales para llevar a cabo el adecuado control de calidad de estos compuestos. El Capítulo VII describe el desarrollo de dos metodologías analíticas por CE en el modo EKC con detección UV para la separación y cuantificación enantiomérica de triptófano y 4-hydroxi-prolina. Para triptófano, se desarrolló un método quiral que permite la separación de sus enantiómeros utilizando una CD como selector quiral en condiciones ácidas utilizando inyección por el extremo corto del capilar. Además, se ha desarrollado la primera metodología quiral por CE que permite la separación de los cuatro estereoisómeros de la 4-hidroxi-prolina empleando una CD neutra a pH 7.0 tras su previa derivatización con FMOC. Ambas metodologías permiten detectar hasta un 0.1% de las impurezas enantioméricas y se aplicaron al análisis de suplementos dietéticos y nutricosméticos.